

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000 年 12 月 21 日 (21.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/77172 A1

(51) 国際特許分類: C12N 1/21, C12P 13/08, C12N 15/54
// (C12N 1/21, C12R 1:13) (C12P 13/08, C12R 1:13)
(C12N 15/54, C12R 1:13) (C12N 15/54, C12R 1:19)

奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 発酵
技術研究所内 Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/03736

(74) 代理人: 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.); 〒
103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコ
ヤマビル6階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2000 年 6 月 8 日 (08.06.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/168377 1999 年 6 月 15 日 (15.06.1999) JP
特願平11/311111 1999 年 11 月 1 日 (01.11.1999) JP

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株
式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒104-8315
東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 杉本雅一 (SUG-
IMOTO, Masakazu) [JP/JP]. 中村 純 (NAKAMURA,
Jun) [JP/JP]. 泉井 裕 (IZUI, Hiroshi) [JP/JP]. 木村英一
郎 (KIMURA, Eiichiro) [JP/JP]. 伊藤久生 (ITO, Hisao)
[JP/JP]. 中松 亘 (NAKAMATSU, Tsuyoshi) [JP/JP]. 倉
橋 修 (KURAHASHI, Osamu) [JP/JP]; 〒210-8681 神

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING L-LYSINE

(54) 発明の名称: L-リジンの製造法

(57) Abstract: A coryneform bacterium having an enhanced 6-phosphofructokinase activity in cell and being capable of producing L-lysine; a process for producing L-lysine characterized by comprising culturing the above coryneform bacterium in a medium, thus forming and accumulating L-lysine in the culture medium, and collecting the L-lysine from the culture medium; and a DNA usable in enhancing the 6-phosphofructokinase activity.

(57) 要約:

細胞中の 6-ホスホフルクトキナーゼ活性が増強され、かつ L-リジン生産能を有するコリネ型細菌、及び、このコリネ型細菌を培地に培養し、該培養物中に L-リジンを生成蓄積せしめ、該培養物から L-リジンを採取することを特徴とする L-リジンの製造法、並びに、6-ホスホフルクトキナーゼ活性の増強に使用できる DNA。

WO 00/77172 A1

明細書

L-リジンの製造法

技術分野

本発明は、発酵法によるL-リジンの製造法並びにそれに好適に用いられる微生物及びDNAに関する。L-リジンは飼料添加物等として広く用いられている。

背景技術

従来、L-リジンは、L-リジン生産能を有するブレバクテリウム属やコリネバクテリウム属に属するコリネ型細菌を用いて発酵法により工業生産されている。これらのコリネ型細菌としては、生産性を向上させるために、自然界から分離した菌株または該菌株の人工変異株が用いられている。

また、組換えDNA技術によりL-リジンの生合成酵素の活性を増強することによって、L-リジンの生産能を増加させる種々の技術が開示されている。例えば、L-リジン生産能を有するコリネ型細菌において、L-リジン及びL-スレオニンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子（変異型lysC）、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子（dapB）、ジヒドロジピコリン酸シンターゼ遺伝子（dapA）、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ遺伝子（lysA）及びジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（ddh）（W096/40934）、LysA及びDDH（特開平9-322774号）、LysC、LysA及びホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子（ppc）（特開平10-165180号）、変異型lysC、dapB、dapA、lysA及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子（aspC）（特開平10-215883号）を導入することにより、同細菌のL-リジン生産能が向上することが知られている。

ところで、エシェリヒア・コリ由来の6-ホスホフルクトキナーゼ（以下、単に「ホスホフルクトキナーゼ」ともいう。）をコリネ型細菌に導入すると、L-グルタミン酸の生産能が向上することが知られている（特開昭63-102692号）。

しかし、ホスホフルクトキナーゼとコリネ型細菌のL-リジン生産能の関係については知られていない。

また、コリネ型細菌のホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子の構造は知られていない。

発明の開示

本発明は、発酵法による効率の良いＬーリジンの製造法並びにそれに用いることのできる菌株及びDNAを提供することを課題とする。

本発明者等は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、ホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子をコリネ型細菌に導入し、ホスホフルクトキナーゼ活性を増強することにより、Ｌーリジンの生産量を増大させることができることを見出した。さらに、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムから新規なホスホフルクトキナーゼ遺伝子を単離することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

(１) 細胞中のホスホフルクトキナーゼ活性が増強され、かつＬーリジン生産能を有するコリネ型細菌。

(２) 前記ホスホフルクトキナーゼ活性の増強が、前記細菌細胞内のホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子のコピー数を高めることによるものである(１)のコリネ型細菌。

(３) 前記ホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子がエシェリヒア属細菌由来である(２)のコリネ型細菌。

(４) 前記(１)～(３)のいずれかのコリネ型細菌を培地に培養し、該培養物中にＬーリジンを生成蓄積せしめ、該培養物からＬーリジンを採取することを特徴とするＬーリジンの製造法。

(５) 下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列表の配列番号１２に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号１２に記載のアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ホスホフルクトキナーゼ活性を有するタンパク質。

(６) 下記(a)又は(b)に示すDNAである(５)のDNA。

(a) 配列表の配列番号 11 の塩基番号 116 ~ 1153 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列表の配列番号 11 の塩基番号 116 ~ 1153 からなる塩基配列を有する DNA 又は同 DNA から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ホスホフルクトキナーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

< 1 > 本発明のコリネ型細菌

本発明のコリネ型細菌は、L-リジン生産能を有し、細胞中のホスホフルクトキナーゼ活性が増強されたコリネ型細菌である。ホスホフルクトキナーゼ活性とは、フルクトース 6-リン酸の 1 位にリン酸基を転移する反応を触媒する活性をいう。

本発明でいうコリネ型細菌は、バーギーズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) 第8版599頁 (1974) に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性で、孢子形成能を有しない桿菌であり、従来ブレビバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合された細菌を含み (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981))、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレビバクテリウム属細菌及びマイクロバテリウム属細菌を含む。L-リジンの製造に好適に用いられるコリネ型細菌の菌株としては、例えば以下に示すものが挙げられる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム	ATCC13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミクム	ATCC15806
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC15991
コリネバクテリウム・グルタミクム	ATCC13032
(ブレビバクテリウム・ディバリカタム)	ATCC14020
(ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム)	ATCC13869

(コリネバクテリウム・リリウム)	ATCC15990
(ブレビバクテリウム・フラバム)	ATCC14067
コリネバクテリウム・メラセコーラ	ATCC17965
ブレビバクテリウム・サッカロリテイクム	ATCC14066
ブレビバクテリウム・インマリオフィルム	ATCC14068
ブレビバクテリウム・ロゼウム	ATCC13825
ブレビバクテリウム・チオゲニタリス	ATCC19240
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム	ATCC15354
コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス	AJ12340(FERM BP-1539)

これらを手に入れるには、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより分譲を受けることができる。すなわち、各微生物ごとに対応する登録番号が付与されており、この登録番号を引用して分譲を受けることができる。各微生物に対応する登録番号はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカタログに記載されている。また、AJ12340株は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にブダペスト条約に基づいて寄託されている。

また、上記菌株以外にも、これらの菌株から誘導されたL-リジン生産能を有する変異株等も、本発明に利用できる。このような人工変異株としては次の様なものがある。S-(2-アミノエチル)-システイン(以下、「AEC」と略記する)耐性変異株(例えば、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムAJ11082(NRR L B-11470)、特公昭56-1914号、特公昭56-1915号、特公昭57-14157号、特公昭57-14158号、特公昭57-30474号、特公昭58-10075号、特公昭59-4993号、特公昭61-35840号、特公昭62-24074号、特公昭62-36673号、特公平5-11958号、特公平7-112437号、特公平7-112438号参照)、その成長にL-ホモセリン等のアミノ酸を必要とする変異株(特公昭48-28078号、特公昭56-6499号)、AECに耐性を示し、更にL-ロイシン、L-ホモセリン、L-プロリン、L-セリン、L-アルギニン、L-アラニン、L-バリン等のアミノ酸を要求する変異株(米国特許第3708395号及び第3825472号)、DL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタム、 α -アミノ-ラウリルラクタム、アスパラギン酸-アナログ、スルファ剤、キノイド、N-ラウロイルロイシンに耐性を示すL-リジン生産変異株、オキザロ酢酸脱炭酸酵

素（デカルボキシラーゼ）または呼吸系酵素阻害剤に耐性を示すL-リジン生産変異株（特開昭50-53588号、特開昭50-31093号、特開昭52-102498号、特開昭53-9394号、特開昭53-86089号、特開昭55-9783号、特開昭55-9759号、特開昭56-32995号、特開昭56-39778号、特公昭53-43591号、特公昭53-1833号）、イノシトールまたは酢酸を要求するL-リジン生産変異株（特開昭55-9784号、特開昭56-8692号）、フルオロビルビン酸または34℃以上の温度に対して感受性を示すL-リジン生産変異株（特開昭55-9783号、特開昭53-86090号）、エチレングリコールに耐性を示し、L-リジンを生産するブレビバクテリウム属またはコリネバクテリウム属の変異株（米国特許第4411997号）。

なお、本明細書において「L-リジン生産能」とは、コリネ型細菌を培地に培養したときに、培地中に有意な量のL-リジンを蓄積する能力、又は菌体中のL-リジン含量を増加させる能力をいう。

<2>ホスホフルクトキナーゼ活性の増強

コリネ型細菌細胞中のホスホフルクトキナーゼ活性を増強するには、ホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子断片を、該細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組み換えDNAを作製し、これをL-リジン生産能を有するコリネ型細菌に導入して形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子のコピー数が上昇する結果、ホスホフルクトキナーゼ活性が増強される。ホスホフルクトキナーゼは、エシェリヒア・コリではpfkA遺伝子およびpfkB遺伝子にコードされている。

ホスホフルクトキナーゼ遺伝子は、コリネ型細菌の遺伝子を用いることも、エシェリヒア属細菌等の他の生物由来の遺伝子を使用することもできる。

エシェリヒア・コリのpfkB遺伝子の塩基配列は既に明らかにされている（Daldal, F., Gene, 28, 337-342 (1984)、Daldal, F., J. Mol. Biol. 168, 285-305 (1983)、Genbank/EMBL/DDBJ accession No. K00128）ので、その塩基配列に基づいて作製したプライマー、例えば配列表配列番号1及び2に示すプライマーを用いて、エシェリヒア・コリ染色体DNAを鋳型とするPCR法（PCR：polymerase chain reaction；White, T. J. et al., Trends Genet. 5, 185 (1989)参照）によって、pfkB遺伝子を取得することができる。エシェリヒア・コリのpfkA

遺伝子も既に明らかにされている (Eur. J. Biochem. 149 (2), 363-373 (1985)) ので、同様にして pfkA 遺伝子を取得することができる。コリネ型細菌等の他の微生物のホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子も、同様にして取得され得る。

染色体 DNA は、DNA 供与体である細菌から、例えば、斎藤、三浦の方法 (H. Saito and K. Miura, Biochem. Biophys. Acta 72, 619 (1963)、生物工学実験書、日本生物工学会編、97～98 頁、培風館、1992 年参照) 等により調製することができる。

コリネ型細菌のホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子 (pfk 遺伝子) は、前記のエシェリヒア・コリの pfkA 遺伝子 (Eur. J. Biochem. 149 (2), 363-373 (1985)) 及びストレプトマイセス・セリカラーの pfk 遺伝子 (Appl. Environ. Microbiol. 63 (3), 956-961 (1997)) などの公知のホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列の間で相同性の高い領域を選択し、そのアミノ酸配列に基づいて作製されるプライマーを用いた PCR によりその一部を単離することができる。そのようなプライマーとして、配列番号 3 および配列番号 4 に示すオリゴヌクレオチドが挙げられる。

上記のようにして得られる pfk 遺伝子断片を用いて同遺伝子の全長配列を決定するには、インバース (inverse) PCR 法 (Genetics 120, 621-623 (1988) や、LA-PCR in vitro cloning kit (宝酒造(株)) を用いる方法等がある。後記実施例では、インバース PCR 法を採用した。具体的には例えば、配列番号 7 及び配列番号 8 に示すオリゴヌクレオチドをプライマーに用い、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム染色体 DNA を鋳型として PCR を行う。さらに、得られた増幅産物を鋳型として配列番号 9 及び配列番号 10 に示すオリゴヌクレオチドを用いてネステッド (Nested) PCR (Technique, 1, 165-170 (1989)) を行う。こうして決定される塩基配列のうち、pfk 遺伝子を含む約 1300bp の塩基配列を、配列表配列番号 11 に示す。この塩基配列から推定されるオープン・リーディング・フレームをアミノ酸配列に翻訳した配列を配列番号 12 に示す。このブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムの pfk 遺伝子は、既知の配列との相同性比較の結果、新規な遺伝子であることが判明した。同遺伝子のコード領域を含む DNA 断片は、上記の方法の他、配列番号 11 記載の塩基配列のうち、5' 及び 3' 非翻訳領域の塩

基配列を利用してPCRを行うことによって取得することができる。

ホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子は、コードされるホスホフルクトキナーゼの活性が損なわれない限り、配列番号12に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むホスホフルクトキナーゼをコードするものであってもよい。ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なる。それは、イソロイシンとバリンのように、アミノ酸によっては、類縁性の高いアミノ酸が存在し、そのようなアミノ酸の違いが、蛋白質の立体構造に大きな影響を与えないことに由来する。例えば、ブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタムのpfk遺伝子がコードするホスホフルクトキナーゼは、配列番号11に記載のアミノ酸配列全体に対し、70～80%以上、好ましくは80～90%以上の相同性を有し、ホスホフルクトキナーゼ活性を有するものであってもよい。ここで相同性は、Lipman-Pearsonの方法(Science 227, 1435-1441 (1985))又はTakashi & Gotohの方法(J. Biochem. 92, 1173-1177 (1984))により算出される値である。具体的には、前記「数個」は、2～30個、好ましくは、2～20個、より好ましくは2～10個である。

上記のようなホスホフルクトキナーゼと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むようにpfk遺伝子の塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、pfk遺伝子をコードするDNAをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及びpfk遺伝子をコードするDNAを保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等には、ホスホフルクトキナーゼを保持するコリネ型細菌の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異(mutant又はvariant)も含まれる。

上記のような変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現産物のホス

ホスホフルクトキナーゼ活性を調べることにより、ホスホフルクトキナーゼと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。また、変異を有するホスホフルクトキナーゼをコードするDNAまたはこれを保持する細胞から、例えば配列表の配列番号12に記載の塩基配列のうち、塩基番号116～1153からなる塩基配列を有するDNA、又はDNAからPCR等によって調製され得るオリゴヌクレオチドプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ホスホフルクトキナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、ホスホフルクトキナーゼと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば70%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する条件が挙げられる。ここで相同性は、Lipman-Pearsonの方法(Science 227, 1435-1441 (1985))又はTakashi & Gotohの方法(J. Biochem. 92, 1173-1177 (1984))により算出される値である。プローブの設計は、当業者に公知の方法に従って行うことができる。

このような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の活性発現ベクターにつなぎホスホフルクトキナーゼ活性を測定することによって容易に取り除くことができる。ホスホフルクトキナーゼ活性は、例えば、Bloxham, D.P. and Lardy, H.A., The Enzymes (3rd ed.), 8, 239-278 (1973))に記載の方法により測定することができる。

上記のようにして得られるホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子は、エシェリヒア・コリ及び／又はコリネ型細菌の細胞内において自律複製可能なベクターDNAに接続して組換えDNAを調製し、これをエシェリヒア・コリ細胞に導入しておくこと、後の操作がしやすくなる。エシェリヒア・コリ細胞内において

自律複製可能なベクターとしては、プラスミドベクターが好ましく、また、宿主の細胞内で自立複製可能なものが好ましく、例えば pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG399、pHSG398、RSF1010等が挙げられる。

コリネ型細菌の細胞内において自律複製可能なベクターとしては、pAM330（特開昭58-67699号公報参照）、pHM1519（特開昭58-77895号公報参照）等が挙げられる。また、これらのベクターからコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力を持つDNA断片を取り出し、前記エシェリヒア・コリ用のベクターに挿入すると、エシェリヒア・コリ及びコリネ型細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。このようなシャトルベクターとしては、以下のものが挙げられる。尚、それぞれのベクターを保持する微生物の国際寄託機関の受託番号をカッコ内に示した。

- pAJ655 *エシェリヒア・コリ*AJ11882(FERM BP-136)
 *コリネバクテリウム・ゲルタミクム*SR8201(ATCC39135)
- pAJ1844 *エシェリヒア・コリ*AJ11883(FERM BP-137)
 *コリネバクテリウム・ゲルタミクム*SR8202(ATCC39136)
- pAJ611 *エシェリヒア・コリ*AJ11884(FERM BP-138)
- pAJ3148 *コリネバクテリウム・ゲルタミクム*SR8203(ATCC39137)
- pAJ440 *バチルス・ズブチリス*AJ11901(FERM BP-140)
- pHC4 *エシェリヒア・コリ*AJ12617(FERM BP-3532)

ホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子とコリネ型細菌で機能するベクターを連結して組み換えDNAを調製するには、ホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。

上記のように調製した組み換えDNAをコリネ型細菌に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリ K-12 について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法（Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)）があり、バチルス・ズブチリスについて報告されているような、増

殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法 (Duncan, C. H., Wilson, G. A. and Young, F. E., *Gene*, 1, 153 (1977)) がある。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法 (Chang, S. and Choen, S. N., *Molec. Gen. Genet.*, 168, 111 (1979); Bibb, M. J., Ward, J. M. and Hopwood, O. A., *Nature*, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75 1929 (1978)) も応用できる。本発明の実施例で用いた形質転換の方法は、電気パルス法 (特開平2-207791号公報参照) である。

ホスホフルクトキナーゼをコードする活性の増強は、ホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子を上記宿主の染色体DNA上に多コピー存在させることによって達成できる。コリネ型細菌に属する微生物の染色体DNA上にホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レベティティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、ホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。いずれの方法によっても形質転換株内のホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子のコピー数が上昇する結果、ホスホフルクトキナーゼ活性が増強される。

ホスホフルクトキナーゼ活性の増強は、上記の遺伝子増幅による以外に、染色体DNA上又はプラスミド上のホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される。たとえば、*lac*プロモーター、*trp*プロモーター、*trc*プロモーター、*tac*プロモーター、ラムダファージの P_R プロモーター、 P_L プロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。これらのプロモーターへの置換により、ホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子の発現が強化されることによってホ

スホフルクトキナーゼ活性が増強される。

また、本発明のコリネ型細菌は、ホスホフルクトキナーゼ活性に加えて、他のL-リジン生合成経路又は解糖系等の酵素遺伝子を導入または増幅することによって、それらの酵素活性が増強されてもよい。例えば、L-リジンの製造に利用可能な遺伝子の例としては、L-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼ α サブユニット蛋白質又は β サブユニット蛋白質をコードする遺伝子(W094/25605国際公開パンフレット)、コリネホルム細菌由来の野生型ホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子(特開昭60-87788号公報)、コリネホルム細菌由来の野生型ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子(特公平6-55149号公報)等が知られている。

さらに、L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。例えば、L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、ホモセリンデヒドロゲナーゼがある(WO 95/23864参照)。

なお、本明細書において、酵素の「活性が増強されている」とは、通常には、野生株よりも細胞内のその酵素活性が高いことを意味し、遺伝子組換え技術等による改変によりその酵素活性が増強された菌株を得た場合には、改変前の菌株よりも細胞内のその酵素活性が高いことを意味する。また、酵素の「活性が低下している」とは、通常には、野生株よりも細胞内のその酵素活性が低いことを意味し、遺伝子組換え技術等による改変によりその酵素活性が低下した菌株を得た場合には、改変前の菌株よりも細胞内のその酵素活性が低いことを意味する。

<3> L-リジンの生産

ホスホフルクトキナーゼ活性が増強され、かつL-リジン生産能を有するコリネ型細菌を好適な培地で培養すれば、L-リジンが培地に蓄積する。

本発明の微生物を培養するのに用いる培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機微量栄養素を含有する通常の培地である。炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトース、シュクロース、廃糖蜜、澱粉加水分解物などの炭水化物、エタノールやイノシトールなどのアル

コール類、酢酸、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。

窒素源としては、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、アンモニア、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、酵母エキス、コーン・スティープ・リカー、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

無機イオンまたはその源としては、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。有機微量栄養素としては、ビタミンB₁などの要求物質または酵母エキス等を必要に応じ適量含有させることが望ましい。

培養は、振とう培養、通気攪拌培養等による好氣的条件下で16～72時間実施するのがよく、通常には、培養温度は30℃～45℃に、培養中pHは5～9に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

発酵液からのL-リジンは、通常、イオン交換樹脂法、沈澱法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

実施例1 エシェリヒア・コリpfkB遺伝子のコリネ型細菌のL-リジン生産株への導入、及びL-リジンの製造

<1>エシェリヒア・コリJM109株のpfkB遺伝子のクローニング

エシェリヒア・コリのpfkB遺伝子の塩基配列は既に明らかにされている(Daldal, F., Gene, 28, 337-342 (1984)、Daldal, F., J. Mol. Biol. 168, 285-305 (1983), Genbank/EMBL/DDBJ accession No. K00128)。報告されている塩基配列に基づいて配列表配列番号1及び2に示すプライマーを合成し、エシェリヒア・コリJM109株の染色体DNAを鋳型にしてPCR法によりホスホフルクトキナーゼ遺伝子を増幅した。

合成したプライマーの内、配列番号1は、Daldal, F., Gene, 28, 337-342 (1984)に記載されているpfb遺伝子の塩基配列の1番目から24番目の塩基に至る配列に相当し、配列番号2は、1268番目から1245番目の塩基に至る配列に相当する。

エシェリヒア・コリJM109株の染色体DNAの調製は常法によった(生物学実験書、日本生物工学会編、97~98頁、培風館、1992年)。また、PCR反応は、PCR法最前線(関谷剛男ほか編、共立出版社、1989年)185頁に記載されている標準反応条件を用いた。

生成したPCR産物を常法により精製後、SmaIで切断したプラスミドpHC4(特開平5-7491号参照)と、ライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結した後、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル(宝酒造社製)を用いて形質転換を行い、クロラムフェニコール5 μ g/mlを含むL培地(バクトトリブトン10g/L、バクトイーストエキストラクト5g/L、NaCl 5g/L、寒天15g/L、pH7.2)に塗布し、一晚培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。取得した形質転換体よりプラスミドを抽出し、ベクターにpfb遺伝子が結合したプラスミドpHC4pfbを得た。

pHC4を保持するエシェリヒア・コリは、プライベートナンバーAJ12617と命名され、1991年4月24日に、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)に受託番号FERM P-12215として寄託され、1991年8月26日に、ブタベスト条約に基く国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-3532が付与されている。

次に、クローニングされたDNA断片がホスホフルクトキナーゼ活性を有するタンパク質をコードしていることを確認するため、JM109株及び、pHC4pfbを保持するJM109株のホスホフルクトキナーゼ活性を、Bloxham, D.P. and Lardy, H.A., The Enzymes (3rd ed.), 8, 239-278 (1973))に記載の方法により測定した。その結果、pHC4pfbを保持するJM109株は、pHC4pfbを保持しないJM109株の約15倍のホスホフルクトキナーゼ活性を示すことから、pfb遺伝子が発現していることを確認した。

<3> コリネ型細菌のL-リジン生産株へのpHC4pfkの導入とL-リジン生産

ブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタムAJ11082を電気パルス法（特開平2-207791号公報参照）によりプラスミドpHC4pfkで形質転換し、形質転換株を得た。得られた形質転換株AJ11082/pHC4pfkを用いてL-リジン生産のための培養を以下のように行った。5 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むCM2Bプレート培地にて培養して得たAJ11082/pHC4pfk株の菌体を、5 μ g/mlのクロラムフェニコールを含む下記組成のL-リジン生産培地に接種し、31.5 $^{\circ}$ Cにて培地中の糖が消費されるまで振とう培養した。コントロールとしてコリネバクテリウム属細菌AJ11082株に、既に取得されているコリネバクテリウム属細菌を自律複製可能なプラスミドpHC4で電気パルス法により形質転換した菌株を上記と同様にして培養した。

ブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタムAJ11082は、1981年1月31日に農学研究菌培養収集所（Agricultural Research Culture Collection、アメリカ合衆国 イリノイ州61604ピオリア ノースユニバーシティ通り1815（1815 N. University Street, Peoria, Illinois 61604 U.S.A.））に寄託され、受託番号NRR L B-11470が付与されている。

〔L-リジン生産培地〕

炭酸カルシウム以外の下記成分（1 L中）を溶解し、KOHでpH8.0に調製し、11 $^{\circ}$ Cで15分殺菌した後、別に乾熱殺菌した炭酸カルシウムを50 g加える。

グルコース	100 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	55 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
ビオチン	500 μ g
チアミン	2000 μ g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g
ニコチンアミド	5 mg
蛋白質加水分解物（豆濃）	30 ml
炭酸カルシウム	50 g

培養終了後、培養液中のL-リジン蓄積量を旭化成工業社製バイオテックアナライザーAS-210により測定した。このときの結果を表1に示す。

表 1

菌 株	L-リジン生成量(g/L)
AJ11082/pHC4	29.9
AJ11082/pHC4pfk	32.8

実施例2 プレバクテリウム・ラクトファーメンタムのpfk遺伝子のクローニング

<1>プレバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869のpfk遺伝子の部分断片取得

公知のpfk遺伝子として、ストレプトマイセス・セリカラーのpfk遺伝子 (Appl. Environ. Microbiol. 63 (3), 956-961 (1997)) と、エシェリヒア・コリのpfkA遺伝子 (Eur. J. Biochem. 149 (2), 363-373 (1985)) がコードするホスホフルクトキナーゼの間でアミノ酸配列の相同性の高い領域を選択し、その配列から塩基配列を推定し、配列番号3および配列番号4に示すオリゴヌクレオチドを合成した。

一方、Bacterial Genome DNA Purification Kit (Advanced Genetic Technologies Corp.) を用いて、プレバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869の染色体DNAを調製した。この染色体DNAの0.5 μ g、前記オリゴヌクレオチドのそれぞれ20pmol、dNTPミクスチャー (各2.5mM) 4 μ l、10 \times ExTaq Buffer (宝酒造) 5 μ lおよびExTaq (宝酒造) 1Uに滅菌水を加えて、全量50 μ lのPCR反応液を調製した。

上記の反応液をサーマルサイクラーTP240 (宝酒造) を用いて、変性94 $^{\circ}$ C 30秒、

会合（アニーリング）37°C～60°C 15秒、伸長反応72°C 45秒の条件で、30サイクルのPCRを行ない、PCR産物をアガロースゲル電気泳動したところ、会合温度45°Cの反応液に約460bpのバンドが含まれることが判明した。

上記の会合温度45°Cの反応液に含まれる反応物を、Original TA Cloning Kit (in vitro gen.)を用いてpCR2.1(in vitro gen.)に連結した。連結反応液を用いて、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル（宝酒造）を形質転換し、IPTG（イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド）10 μ g/ml、X-Gal（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド）40 μ g/ml及びカナマイシン25 μ g/mlを含むL培地（バクトトリプトン10g/l、バクトイーストエキストラクト5g/l、NaCl 5g/l、寒天15g/l、pH7.2）に塗布し、一晚培養後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換株を得た。

形質転換株からアルカリ法（生物工学実験書、日本生物工学会編、105頁、培風館、1992年）を用いてプラスミドを調製し、配列番号5および配列番号6に示すオリゴヌクレオチドを用いて、挿入断片の両端の塩基配列をSangerの方法（J. Mol. Biol., 143, 161（1980））で決定した。具体的には、塩基配列の決定にはBigdye terminator sequencing kit（Applied Biosystems）を用いてGenetic Analyzer ABI310（Applied Biosystems）で解析した。決定された塩基配列をアミノ酸に翻訳し、ストレプトマイセス・セリカラーおよびエシェリヒア・コリのpfk遺伝子から予測されるアミノ酸配列と比較したところ、高い相同性を示したことから、pCR2.1にクローニングされた断片は、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム由来のPFK遺伝子であると判断した。

<2>ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムATCC13869のpfk遺伝子の全塩基配列決定

上記<1>で調製したプラスミドに含まれる断片はpfk遺伝子の部分断片であり、さらにpfk遺伝子全長の塩基配列を決定する必要がある。既知の領域に隣接する未知の塩基配列を決定する方法として、インバースPCR（Genetics 120, 621-623(1988)）法や、LA-PCR in vitro cloning kit（宝酒造）を用いる方法などがあるが、ここでは、以下のようにしてインバースPCR法により未知配列の決定を行なった。

前記< 1 >で決定した塩基配列をもとに配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 および配列番号 10 に示すオリゴヌクレオチドを合成した。一方、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869 の染色体 DNA を EcoRI, BamHI, KpnI, HindIII, PstI, SphI, SacI, SalI (宝酒造) それぞれで完全分解し、これを Ligation kit Ver.2 (宝酒造) を用いて分子内連結反応により環状化した。環状化した染色体 DNA の 0.5 μ g、配列番号 7 および配列番号 8 のオリゴヌクレオチドのそれぞれ 10 pmol、dNTP ミクスチャー (各 2.5 mM) 4 μ l、10 \times ExTaq Buffer (宝酒造) 5 μ l 並びに ExTaq (宝酒造) 1U に滅菌水を加えて全量 50 μ l の PCR 反応液を調製した。この反応液をサーマルサイクラー TP240 を用いて、変性 94 $^{\circ}$ C 30 秒、会合 55 $^{\circ}$ C 15 秒、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 3 分の条件で 30 サイクルの PCR を行なった。

上記の PCR 産物を アガロースゲル電気泳動により分析したが、いずれの制限酵素を用いた場合にも、明確に増幅産物が認められなかったため、さらにネステッド PCR (Technique, 1, 165-170 (1989)) を行なった。鋳型として前記のそれぞれの PCR 反応液を滅菌水にて 1000 倍希釈したもの 1 μ l、配列番号 9 および配列番号 10 に示すオリゴヌクレオチドのそれぞれ 10 pmol、dNTP ミクスチャー (各 2.5 mM) 4 μ l、10 \times ExTaq Buffer (宝酒造) 5 μ l 並びに ExTaq (宝酒造) 1U に滅菌水を加えて全量 50 μ l の PCR 反応液を調製した。この反応液をサーマルサイクラー TP240 を用いて、変性 94 $^{\circ}$ C 30 秒、会合 55 $^{\circ}$ C 15 秒、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 3 分の条件で 30 サイクルの PCR を行なった。

PCR 反応液のアガロースゲル電気泳動を行なったところ、PstI で分解し、分子内連結反応を行なったものを鋳型としたものから、約 2000 bp のバンドが認められた。このバンドを Suprec ver.2 (宝酒造) を用いて精製し、配列番号 9 および配列番号 10 に示すオリゴヌクレオチドを用いて < 1 > 記載の方法と同様にして 2000 bp の PCR 産物に含まれる pfk 遺伝子の塩基配列を決定した。

こうして決定された塩基配列のうち、pfk 遺伝子を含む約 1300 bp の塩基配列を配列表配列番号 11 に示す。この塩基配列から推定されるオープン・リーディング・フレームをアミノ酸配列に翻訳した配列を配列番号 12 に示した。すなわち、配列表配列番号 12 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質が、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869 のホスホフルクトキナーゼである。

なお、タンパク質N末端側にあるメチオニン残基は開始コドンであるATGに由来するため、タンパク質本来の機能とは無関係であることが多く、翻訳後ペプチダーゼの働きにより除去されることがよく知られており、上記タンパク質の場合にもメチオニン残基の除去が生じている可能性がある。

塩基配列、アミノ酸配列おのおのについて既知の配列との相同性比較を行なった。用いたデータベースは、GenBankおよびSWISS-PROTである。その結果、配列表配列番号11に示されるDNAは、既に報告されているエシェリヒア・コリのpfkAによりコードされるPFKと相同性を持つタンパク質をコードする、コリネ型細菌では新規な遺伝子であることが判明した。

産業上の利用の可能性

本発明により、コリネ型細菌のL-リジン生産能を向上させることができ、一層効率のよいL-リジンの製造法が提供される。また、本発明のブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムのホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子は、コリネ型細菌のL-リジン生産菌の育種に好適に利用することができる。

請求の範囲

1. 細胞中の6-ホスホフルクトキナーゼ活性が増強され、かつL-リジン生産能を有するコリネ型細菌。
2. 前記6-ホスホフルクトキナーゼ活性の増強が、前記細菌細胞内の6-ホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子のコピー数を高めることによるものである請求項1記載のコリネ型細菌。
3. 前記6-ホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子がエシェリヒア属細菌由来である請求項2記載のコリネ型細菌。
4. 請求項1～3のいずれか一項に記載のコリネ型細菌を培地に培養し、該培養物中にL-リジンを生成蓄積せしめ、該培養物からL-リジンを採取することを特徴とするL-リジンの製造法。
5. 下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNA。
(A) 配列表の配列番号12に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。
(B) 配列表の配列番号12に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、6-ホスホフルクトキナーゼ活性を有するタンパク質。
6. 下記(a)又は(b)に示すDNAである請求項5記載のDNA。
(a) 配列表の配列番号11の塩基番号116～1153からなる塩基配列を含むDNA。
(b) 配列表の配列番号11の塩基番号116～1153からなる塩基配列を有するDNA又は同DNAから調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、6-ホスホフルクトキナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

配列表 (Sequence Listing)

<110> 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Inc.)

<120> L-リジンの製造法

<130> B-593MSOP977

<150> JP 11-311111

<151> 1999-11-01

<150> JP 11-168377

<151> 1999-06-15

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for amplifying Escherichia coli pfkB gene

<400> 1

aagcttcatt tatcaagagt ccgt

24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for amplifying Escherichia coli pfkB gene

<400> 2

tgattccccc aatgctgggg gttt

24

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer 1 for pfk cloning

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)

<223> n=a or g or c or t

<400> 3

acnathgaya aygayrt

17

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer 2 for pfk cloning

<220>

<221> misc_feature

<222> (3,6,9,15)

<223> n=a or g or c or t

<400> 4

gtncncncnc kytgnayrtg

20

<210> 5

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: sequence primer M13-20

<400> 5

gtaaaacgac ggccag

16

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: sequence primer M13RV

<400> 6

caggaaacag ctatgac

17

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Inverse PCR primer 1A

<400> 7

agcaatccaa cccacgtggc

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Inverse PCR primer 1B

<400> 8

acattgacca gttcggtcac

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: nested primer A

<400> 9

ggcccatgac ctccacgatc

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: nested primer B

<400> 10

gaccttcacg ggaattggac

20

<210> 11

<211> 1357

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (116)..(1153)

<400> 11

ctgcagctct ggcgattaaa taagggtggtc agagacaatt tttcggcctg tcaaccctg 60
tgattctett atttttgggt gattgttccg gcgcgggtgt tgtgatgggt ttaat atg 118

Met
1

gaa gac atg cga att gct act ctc acg tca ggc ggc gac tgc ccc gga 166
 Glu Asp Met Arg Ile Ala Thr Leu Thr Ser Gly Gly Asp Cys Pro Gly
 5 10 15

cta aat gcc gtc atc cga gga atc gtc cgc aca gcc agc aat gaa ttt 214
 Leu Asn Ala Val Ile Arg Gly Ile Val Arg Thr Ala Ser Asn Glu Phe
 20 25 30

ggc tcc acc gtc gtt ggt tat caa gac ggt tgg gaa gga ctg tta gcc 262
 Gly Ser Thr Val Val Gly Tyr Gln Asp Gly Trp Glu Gly Leu Leu Ala
 35 40 45

gat cgt cgc gta cag ctg tat gac gat gaa gat att gac cga atc ctc 310
 Asp Arg Arg Val Gln Leu Tyr Asp Asp Glu Asp Ile Asp Arg Ile Leu
 50 55 60 65

ctt cga ggc ggc acc att ttg ggc act ggt cgc ctc cat ccg gac aag 358
 Leu Arg Gly Gly Thr Ile Leu Gly Thr Gly Arg Leu His Pro Asp Lys
 70 75 80

ttt aag gcc gga att gat cag att aag gcc aac tta gaa gac gcc ggc 406
 Phe Lys Ala Gly Ile Asp Gln Ile Lys Ala Asn Leu Glu Asp Ala Gly
 85 90 95

atc gat gcc ctt atc cca atc ggt ggc gaa gga acc ctg aag ggt gcc 454
 Ile Asp Ala Leu Ile Pro Ile Gly Gly Glu Gly Thr Leu Lys Gly Ala
 100 105 110

aag tgg ctg tct gat aac ggt atc cct gtt gtc ggt gtc cca aag acc 502
 Lys Trp Leu Ser Asp Asn Gly Ile Pro Val Val Gly Val Pro Lys Thr
 115 120 125

att gac aat gac gtg aat ggc act gac ttc acc ttc ggt ttc gat act 550
 Ile Asp Asn Asp Val Asn Gly Thr Asp Phe Thr Phe Gly Phe Asp Thr
 130 135 140 145

gct gtg gca gtg gct acc gac gct gtt gac cgc ctg cac acc acc gct 598
 Ala Val Ala Val Ala Thr Asp Ala Val Asp Arg Leu His Thr Thr Ala
 150 155 160

gaa tct cac aac cgt gtg atg atc gtg gag gtc atg ggc cgc cac gtg 646
 Glu Ser His Asn Arg Val Met Ile Val Glu Val Met Gly Arg His Val
 165 170 175

ggt tgg att gct ctg cac gca ggt atg gcg ggc ggt gct cac tac acc 694
 Gly Trp Ile Ala Leu His Ala Gly Met Ala Gly Gly Ala His Tyr Thr
 180 185 190

gtt att cca gaa gta cct ttc gat att gca gag atc tgc aag gcg atg 742
 Val Ile Pro Glu Val Pro Phe Asp Ile Ala Glu Ile Cys Lys Ala Met
 195 200 205
 gaa cgt cgc ttc cag atg ggc gag aag tac ggc att atc gtc gtt gcg 790
 Glu Arg Arg Phe Gln Met Gly Glu Lys Tyr Gly Ile Ile Val Val Ala
 210 215 220 225
 gaa ggt gcg ttg cca cgc gaa ggc acc atg gag ctt cgt gaa ggc cac 838
 Glu Gly Ala Leu Pro Arg Glu Gly Thr Met Glu Leu Arg Glu Gly His
 230 235 240
 att gac cag ttc ggt cac aag acc ttc acg gga att gga cag cag atc 886
 Ile Asp Gln Phe Gly His Lys Thr Phe Thr Gly Ile Gly Gln Gln Ile
 245 250 255
 gct gat gag atc cac gtg cgc ctc ggc cac gat gtt cgt acg acc gtt 934
 Ala Asp Glu Ile His Val Arg Leu Gly His Asp Val Arg Thr Thr Val
 260 265 270
 ctt ggc cac att caa cgt ggt gga acc cca act gct ttc gac cgt gtt 982
 Leu Gly His Ile Gln Arg Gly Gly Thr Pro Thr Ala Phe Asp Arg Val
 275 280 285
 ctg gcc act cgt tat ggt gtt cgt gca gct cgt gcg tgc cat gag gga 1030
 Leu Ala Thr Arg Tyr Gly Val Arg Ala Ala Arg Ala Cys His Glu Gly
 290 295 300 305
 agc ttt gac aag gtt gtt gct ttg aag ggt gag agc att gag atg atc 1078
 Ser Phe Asp Lys Val Val Ala Leu Lys Gly Glu Ser Ile Glu Met Ile
 310 315 320
 acc ttt gaa gaa gcc gtc gga acc ttg aag gaa gtc cca ttc gaa cgc 1126
 Thr Phe Glu Glu Ala Val Gly Thr Leu Lys Glu Val Pro Phe Glu Arg
 325 330 335
 tgg gtt act gcc cag gca atg ttt gga tagtttttcg ggcttttacc 1173
 Trp Val Thr Ala Gln Ala Met Phe Gly
 340 345
 aacagccaat aacagctctt tcgctcattg aggtgaaggg gctgtttttt catgccgtaa 1233
 ggaaagtgca agtaagtga atcaagtggc atagatccat tgatgcttag actgtgacct 1293
 aggcttgact ttcgtggggg agtggggata agttcatctt aaacacaatg caatcgattg 1353
 catt 1357

<210> 12

<211> 346

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 12

```

Met Glu Asp Met Arg Ile Ala Thr Leu Thr Ser Gly Gly Asp Cys Pro
  1           5           10           15
Gly Leu Asn Ala Val Ile Arg Gly Ile Val Arg Thr Ala Ser Asn Glu
      20           25           30
Phe Gly Ser Thr Val Val Gly Tyr Gln Asp Gly Trp Glu Gly Leu Leu
      35           40           45
Ala Asp Arg Arg Val Gln Leu Tyr Asp Asp Glu Asp Ile Asp Arg Ile
      50           55           60
Leu Leu Arg Gly Gly Thr Ile Leu Gly Thr Gly Arg Leu His Pro Asp
      65           70           75           80
Lys Phe Lys Ala Gly Ile Asp Gln Ile Lys Ala Asn Leu Glu Asp Ala
      85           90           95
Gly Ile Asp Ala Leu Ile Pro Ile Gly Gly Glu Gly Thr Leu Lys Gly
      100           105           110
Ala Lys Trp Leu Ser Asp Asn Gly Ile Pro Val Val Gly Val Pro Lys
      115           120           125
Thr Ile Asp Asn Asp Val Asn Gly Thr Asp Phe Thr Phe Gly Phe Asp
      130           135           140
Thr Ala Val Ala Val Ala Thr Asp Ala Val Asp Arg Leu His Thr Thr
      145           150           155           160
Ala Glu Ser His Asn Arg Val Met Ile Val Glu Val Met Gly Arg His
      165           170           175
Val Gly Trp Ile Ala Leu His Ala Gly Met Ala Gly Gly Ala His Tyr
      180           185           190
Thr Val Ile Pro Glu Val Pro Phe Asp Ile Ala Glu Ile Cys Lys Ala
      195           200           205
Met Glu Arg Arg Phe Gln Met Gly Glu Lys Tyr Gly Ile Ile Val Val
      210           215           220
Ala Glu Gly Ala Leu Pro Arg Glu Gly Thr Met Glu Leu Arg Glu Gly
      225           230           235           240
His Ile Asp Gln Phe Gly His Lys Thr Phe Thr Gly Ile Gly Gln Gln
      245           250           255
Ile Ala Asp Glu Ile His Val Arg Leu Gly His Asp Val Arg Thr Thr
      260           265           270
Val Leu Gly His Ile Gln Arg Gly Gly Thr Pro Thr Ala Phe Asp Arg

```

8/8

275	280	285
Val Leu Ala Thr Arg Tyr Gly	Val Arg Ala Ala Arg Ala Cys His Glu	
290	295	300
Gly Ser Phe Asp Lys Val Val Ala Leu Lys Gly	Glu Ser Ile Glu Met	
305	310	315
Ile Thr Phe Glu Glu Ala Val Gly Thr Leu Lys Glu Val Pro Phe Glu		320
	325	330
Arg Trp Val Thr Ala Gln Ala Met Phe Gly		335
340	345	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03736

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N1/21, C12P13/08, C12N15/54// (C12N1/21, C12R1:13), (C12P13/08, C12R1:13), (C12N15/54, C12R1:13), (C12N15/54, C12R1:19) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12N1/00-38, C12P13/00-24, C12N15/00-90 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	Eur.J.Biochem. Vol.149, (1985), P.363-373, Homme W.HELLINGA et al. "Nucleotide sequence and high-level expression of the major Escherichia coil phosphofructokinase",	5, 6 1-4
Y A	Gene, Vol.28, (1984), P.337-342, Fevzi Dalda "Nucleotide sequence of gene pfkB encoding the minor phosphofructokinase of Escherichia coil K-12" "	5, 6 1-4
Y A	APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol.63, No.3 (1997), P.956-961, L.DIJKHUIZEN et al., "Identification of ATP-Dependent phosphofructokinase as a Regulatory Step in the Glycolytic Pathway of the Actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2) "	5, 6 1-4
Y A	JP, 63-102692, A (KYOWA HAKKO KOGYO KK), 07 May, 1988 (07.05.88) (Family: none)	5, 6 1-4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 30 August, 2000 (30.08.00)		Date of mailing of the international search report 12 September, 2000 (12.09.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N1/21, C12P13/08, C12N15/54/(C12N1/21, C12R1:13),
(C12P13/08, C12R1:13), (C12N15/54, C12R1:13), (C12N15/54,
C12R1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N1/00~38, C12P13/00~24, C12N15/00~90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN),
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	Eur. J. Biochem. Vol.149, (1985), P.363-373, Homme W.HELLINGA et al. "Nucleotide sequence and high-level expression of the major <i>Escherichia coli</i> phosphofructokinase "	<u>5, 6</u> 1-4
<u>Y</u> A	Gene, Vol.28, (1984), P.337-342, Fevzi Dalda "Nucleotide sequence of gene <i>pfkB</i> encoding the minor phosphofructokinase of <i>Escherichia coli</i> K-12 ⁺ "	<u>5, 6</u> 1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.08.00

国際調査報告の発送日

12.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤 真由美

4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol. 63, No. 3, (1997) P. 956-961, L. DIJKHUIZEN et al. "Identification of ATP-Dependent phosphofructokinase as a Regulatory Step in the Glycolytic Pathway of the Actinomycete <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)"	<u>5, 6</u> 1-4
<u>Y</u> A	JP, 63-102692, A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 07.5月. 1988 (07.05.88) ファミリーなし	<u>5, 6</u> 1-4

